

19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

12) Offenlegungsschrift

10) DE 43 34 351 A 1

21) Aktenzeichen: P 43 34 351.1

22) Anmeldetag: 8. 10. 93

23) Offenlegungstag: 13. 4. 95

51) Int. Cl. 8:

C 08 F 285/00

C 08 F 291/08

C 08 F 4/12

C 08 F 8/00

C 08 J 5/20

C 08 L 51/00

B 01 D 15/08

G 01 N 30/48

C 07 K 1/16

// (C08F 291/08,

220:32,220:04,

220:54)C08F 8/12,

8/30,8/36,B01J

39/20,39/06,41/06

71) Anmelder:

Merck Patent GmbH, 64293 Darmstadt, DE

72) Erfinder:

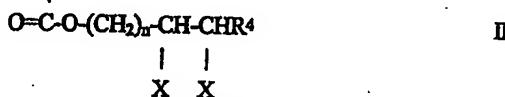
Mack, Margot, Dr., 64689 Grasellenbach, DE; Müller, Egbert, Dr., 64390 Erzhausen, DE; Poguntke, Peter, 64853 Otzberg, DE

71

54) Dendrimere Ppropfpolymerisate

57) Die Erfindung betrifft dendrimere Ppropfpolymerisate auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß
a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel II enthalten

-(CR¹R²-CR³)-



d) die dendrimeren Polymeren Monomereinheiten der Formel III enthalten,

-(CR¹R²-CR³)-



worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,

R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

ein Rest X OH und der andere Rest Y eine endständige Monomereinheit einer weiteren Polymerkette darstellt,
und

Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält, bedeuten. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser dendrimeren Ppropfpolymerisate und ihre Verwendung als Trennmaterialien für die Flüssigkeitschromatographie.

DE 43 34 351 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 02. 95 508 015/200

10/36

Beschreibung

Die Erfindung betrifft dendrimere Ppropfpolymerisate und ihre Verwendung als Trennmaterialien für die Flüssigkeitschromatographie.

5 Aus DE 38 11 042 sind Trennmaterialien für die Chromatographie bekannt, die lineare Ppropfpolymeren aufweisen. Diese Materialien weisen gegenüber Trennmaterialien, die vernetzte Polymere enthalten, deutliche Vorteile auf.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Trennmaterialien mit verbesserten Eigenschaften bereitzustellen.

10 Aus der unveröffentlichten Anmeldung DE 43 10 964 sind oxiranhaltige aktivierte Trägermaterialien bekannt, bei denen Monomere der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger aufgepfpft sind,



15



I

20



worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,
R⁴ H, C₁—C₅-Alkyl oder C₆—C₁₂-Aryl

25 und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

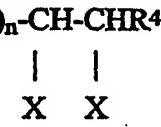
bedeuten. Es wurde gefunden, daß sich diese aktivierte Trägermaterialien zu den erfindungsgemäßen Ppropfpolymerisaten mit dendrimerer Struktur umsetzen lassen. Dabei werden auf das bekannte Ppropfpolymerisat mit linearer Polymerkette (Polymerkette erster Generation) wiederum lineare Polymere aufgepfpft (Polymerkette zweiter Generation), wobei dieser Schritt mehrfach wiederholt werden kann (Polymerketten höherer Generation). So entstehen verzweigte Ppropfpolymeren, die jedoch keine Vernetzung aufweisen. Schließlich werden, entsprechend den vorgesehenen chromatographischen Trennverfahren, Separationseffektoren eingeführt. Die resultierenden Trennmaterialien weisen verbesserte Eigenschaften auf.

Die für die verschiedenen chromatographischen Trennverfahren notwendigen Separationseffektoren sind als feste Phase an einen Basisträger gebunden und gehen unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Analyten der Probe ein. Für verschiedene chromatographische Trennmethoden sind dem Fachmann geeignete Separationseffektoren bekannt; beispielsweise: ionische Gruppen für die Ionenaustauschchromatographie, Affinitätsliganden für Affinitätschromatographie, wozu auch die Metallchelatchromatographie gehört, hydrophobe Gruppen für die hydrophobe Interaktionschromatographie und vorwiegend netzartige poröse hydrophile Gruppen für die Gelpermeationschromatographie.

Gegenstand der Erfindung sind dendrimere Ppropfpolymerisate auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

45 a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
b) die kovalent gebundenen Polymere über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel II enthalten

50



II

55

60 d) und die dendrimeren Ppropfpolymerisate Monomereinheiten der Formel III enthalten,



65



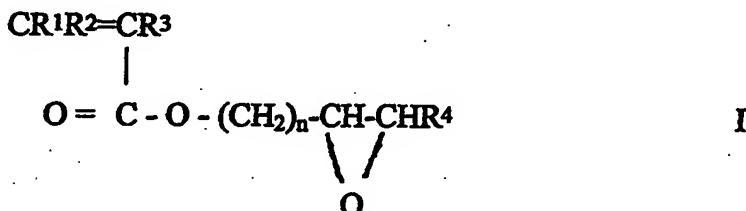
III

worin
 R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,
 R⁴ H, C₁—C₅-Alkyl oder C₆—C₁₂-Aryl,
 n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,
 ein Rest X OH und der andere Rest X eine endständige Monomereinheit einer weiteren Polymerkette 5
 darstellt, und
 Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält,
 bedeuten.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen dendrimeren Ppropfpolymerisaten bei 10
 der Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren,
 mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung von dendrimeren Ppropfpolymerisaten, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte: 15

a) Aufpropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,



20

25

worin
 R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,
 R⁴ H, C₁—C₅-Alkyl oder C₆—C₁₂-Aryl und 30
 n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5
 bedeuten, wobei aus DE 43 10 964 bekannte aktivierte Trägermaterialien entstehen,
 b) zumindest teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;
 c) Aufpropfung von Monomeren der Formel I oder von Monomeren der Formel V auf die in Schritt b) 35
 entstandenen Diolgruppen in Gegenwart von Cer(IV)ionen,



40

45

worin
 W OH oder NHR⁸ und
 R⁸ C₁—C₁₀-Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl-
 oder Sulfonsäurerest substituiert ist,
 bedeuten,
 wobei die Schritte b) und c) einmal oder auch mehrfach wiederholt werden können, 50
 und
 d) Einführung der Reste, die die Separationseffektoren enthalten soweit diese nicht bereits durch die
 Aufpropfreaktion mit Monomeren der Formel V erfolgt ist.

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, 55
 insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie, unter Verwendung der erfindungsgemäßen dendrimeren Ppropfpolymerisaten.

Abb. 1 zeigt die Abhängigkeit von Selektivität α (Kurve A) und Bindungskapazität (Kurve B) von diethylamin-substituierten (DEA) Ionenaustauschern mit verschiedenem Verzweigungsgrad (Probennummer als Abzisse). 60
 Die experimentellen Einzelheiten finden sich in Anwendungsbeispiel A. Es zeigt sich, daß die Selektivität von verzweigtem Material deutlich höher ist als von unverzweigtem Material. Die Bindungskapazität nimmt, verglichen mit unverzweigten Vergleichsmaterial, bei geringer Verzweigung zu, fällt aber bei starker Verzweigung deutlich ab.

Die erfindungsgemäßen dendrimeren Ppropfpolymerisate zeichnen sich durch eine baumartig verzweigte 65
 Struktur aus, wobei ein erstes lineares Polymer auf einen Basisträger, der aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
 aufgepropft ist. Dabei werden Monomere der Formel I, wobei die Reste R¹, R², R³ und R⁴, sowie n die bereits
 genannten Bedeutungen besitzen, in Gegenwart von Cer-IV-Ionen aufgepropft, wobei ein lineares Ppropfpoly-

merisat entsteht. Die Grundzüge dieser Reaktion sind von G. Mino und S. Kaizerman (1958) J. Polymer Science 31, 242–243, und G. Mino et al. (1959) J. Polymer Science 38, 393–401, beschrieben. Das Polymer enthält zunächst Oxiranreste, die anschließend vollständig oder teilweise zu Diolgruppen umgesetzt werden. Dazu wird eine Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure bevorzugt.

5 Auf die somit entstandenen aliphatischen Hydroxylgruppen dieses Polymers (erste Generation) können nun erneut Monomere der Formel I in Gegenwart von Cer-IV-Ionen aufpolymerisiert werden. Das resultierende Polymer (zweite Generation) ist in sich selbst linear. Die Gesamtstruktur ist jedoch verzweigt.

Um zu noch stärker verzweigten dendrimeren Ppropolymerisaten zu gelangen, können die genannten Arbeitsschritte wiederholt werden: Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen und Polymerisation von 10 Monomeren der Formel I in Gegenwart von Cer-IV-Ionen.

15 Schließlich werden die für die chromatographischen Trennungen notwendigen Separationseffektoren eingeführt, die als feste Phase an einen Basisträger gebunden sind, und die unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Analyten der Probe eingehen. Für verschiedene chromatographische Trennungsmethoden sind dem Fachmann geeignete Separationseffektoren bekannt, beispielsweise:

15 a) Für die Ionenaustauschchromatographie sind ionische Gruppen wie beispielsweise quaternäre Ammoniumalkylgruppen und die SO_3^- -Gruppe, sowie ionogene Gruppen, die unter bestimmten pH-Bedingungen Ionen bilden, bekannt. Zu der letzten Gruppe gehören beispielsweise die alkylierten Aminogruppen, sowie die Carboxyl- und die Phosphorsäuregruppe.

20 b) Für die Affinitätschromatographie sind dem Fachmann sehr viele Affinitätsliganden bekannt, die jeweils mit dem Analyten eine strukturell gegebene Bindung eingehen, und die als Separationseffektoren geeignet sind, beispielsweise:

Affinitätsligand	Analyte (Beispiel)
Protein A	Immunglobuline
Concanavalin A	Glycoproteine
Biotin	Avidin/Streptavidin
Avidin	Biotin
Streptavidin	Biotin
5'-Adenosinmonophosphat	NAD-abhängige Oxidoreduktasen
2',5'-Adenosindiphosphat	NADP-abhängige Oxidoreduktasen
Aminoacridin	RNA oder DNA
Boronsäure	Katecholamine
Boronsäure	glykosyliertes Hämoglobin
Iminodiessigsäure	Metalloproteine
"thiophile" Liganden	Immunglobuline
Cibachromblau	monoklonale Antikörper

40 c) Für die hydrophobe Interaktionschromatographie sind ungeladene hydrophobe Separationseffektoren üblich, beispielsweise C_1 – C_{20} -Alkyl, C_6 – C_{25} -Aryl, C_7 – C_{25} -Alkylaryl oder C_7 – C_{25} -Arylalkyl, die auch einfach oder mehrfach mit Nitril oder C_1 – C_5 -Alkoxy derivatisiert sein können, wobei auch eine oder mehrere nicht benachbarte CH_2 -Gruppen durch NH oder O oder auch eine oder mehrere CH-Gruppen durch N ersetzt sein können, oder Polyoxyethylen- oder Polyoxypropylenederivate $[(\text{CH}_2)_m-\text{O}-]_n-\text{R}^9$, worin in 2 oder 3 o eine ganze Zahl zwischen 1 und 200 und R^9 H oder C_1 – C_5 -Alkyl bedeuten. Bevorzugt werden besonders Reste mit mittlerer oder geringer Hydrophobizität.

45 d) Für die Gelpermeationschromatographie werden hydrophile Verbindungen, die vorzugsweise Poren oder Netzwerke ausbilden, als Separationseffektor benutzt. Dazu gehören (Meth)acrylsäurederivate wie Acrylamid oder Methacrylamid, ferner (2,3-Dihydroxypropyl)-methacrylat oder N-(2-Methoxyethyl)acrylamid oder N-(2,3-Dihydroxypropyl)-acrylamid. Außerdem gehören dazu vinylierte Heterocyclen, wie z. B. 1-Vinylimidazol, N-Vinylpyrrolidon, 2-Vinylpyridin, 4-Vinylpyridin, 4-Vinylpyrrolidon-N-oxid.

55 Zur Einführung der Separationseffektoren sind verschiedene Reaktionswege möglich:

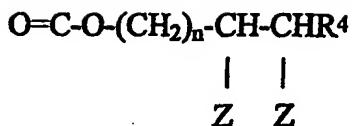
a) Die Separationseffektoren werden durch Reaktion mit den Oxiranresten, die nach der Polymerisation mit Verbindungen der Formel I vorhanden sind, in den Träger eingebaut; z. B.:

60 a1) die Reaktion mit schwefliger Säure oder ihren Salzen oder mit primären, sekundären oder tertiären Aminen, wobei Ionenaustauscher entstehen;

a2) die Reaktion mit Iminodiessigsäure oder die Einführung thiophiler Liganden, oder anderer Affinitätsliganden wie Protein A, wobei Träger für die Affinitätschromatographie entstehen;

a3) die Reaktion mit Alkoholen, Phenolen oder auch primären Aminen, wobei hydrophobe Trennmaterialien entstehen.

65 Bei der Reaktionsfolge nach a1) entstehen beispielsweise Verbindungen, bei denen der Rest Y aus Formel III die Bedeutung von Formel IV besitzt,



IV

5

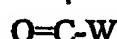
worin
 R^4 H, C_1-C_5 -Alkyl oder C_6-C_{12} -Aryl,
n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,
ein Rest Z OH und der andere Rest Z einen Rest, ausgewählt aus der Gruppe NR^5R^6 , $\text{N}^+\text{R}^5\text{R}^6\text{R}^7$ und SO_3H ,
und
 R^5 , R^6 und R^7 unabhängig voneinander C_1-C_4 -Alkyl, wobei einer oder beide Reste R^5 oder R^6 auch H sein
kann,
bedeuten.

10

b) Bei der letzten Ppropfpolymerisation können statt der Monomeren der Formel I die aus DE 38 11 042
bekannten Monomeren eingesetzt werden, wobei die aus dieser Druckschrift bekannten Gruppen als
Separationseffektoren eingeführt werden. Dazu gehören beispielsweise Monomeren der Formel V,

15

20



V

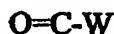
25

worin
 W OH oder NHR^8 und
 R^8 C_1-C_{10} -Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl-
oder Sulfonsäurerest substituiert ist,
bedeuten.

30

In den nach Verfahrensvariante b) hergestellten Trägermaterialien bedeutet der Rest Y aus Formel III einen
Rest nach Formel VI,

35



VI

40

worin
 W OH oder NHR^8 und
 R^8 C_1-C_{10} -Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder
Sulfonsäurerest substituiert ist,
bedeuten.

45

Bevorzugte Monomere der Formel V sind solche, bei denen W eine der folgenden Bedeutungen besitzt: OH,
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, $\text{NHC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ oder $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$.

Nachdem die beschriebenen Umsetzungen ausgeführt wurden, können gegebenenfalls noch verbliebene
Oxiranreste hydrolysiert werden, beispielsweise durch eine abschließende Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure.

50

Die folgenden Beispiele sollen den Gegenstand näher erläutern; diese Beispiele stellen keine Einschränkung
des Erfindungsgegenstandes dar.

Beispiele

55

Herstellungsbeispiele

In den folgenden Herstellungsbeispielen bedeutet Raumtemperatur (RT) 15–30°C. Die Polymerisation wird in
einem Dreihalskolben geeigneter Größe, der mit Rührer, Tropftrichter und Thermometer ausgerüstet ist,
ausgeführt. Gewaschen wird durch Absaugen auf einer Glasfritte (G2).

60

Beispiel 1

Herstellung eines oxiran-aktivierten Trägers ausgehend von Fractogel®-TSK HW 65 (S)

65

Zu einer Suspension aus 100 ml sedimentiertem Fractogel®-TSK HW 65 (S) und 66 ml Wasser werden mit 3 g
Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer Mischung aus 180 ml Wasser und 3 g HNO_3 (65%)) bei Raumtempera-

tur unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 6 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 44 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergeführt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

5

Beispiel 2

Herstellung eines oxiran-aktivierten Trägers ausgehend von LiChrospher®-Diol

Die Herstellung erfolgt entsprechend Beispiel 1, LiChrospher®-DIOL (Partikelgröße 15–25 µm, Porengröße 80 nm) wird als Basisträger anstelle von Fractogel®-TSK HW 65 (S) verwendet.

10

Beispiel 3

Aufpropfung eines Polymeren auf ein diolhaltiges Polymer (Erzeugung der dendrimeren Struktur)

15

Stufe 1

Überführung der Oxiran- in Diolgruppen

20 100 ml abgesaugtes oxiran-aktiviertes Trägermaterial hergestellt nach Beispiel 1 werden mit 200 ml 0.5 M Schwefelsäure (1 Stunde, 50°C) hydrolysiert und somit die Oxirangruppen in Diolgruppen überführt. Anschließend wird dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

25

Stufe 2

Aufpropfen einer weiteren Polymerkette

Zu einer Suspension aus 100 ml sedimentiertem Material aus Stufe 1 und 66 ml Wasser werden mit 3 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer Mischung aus 180 ml Wasser und 3 g HNO₃ (65%)) bei Raumtemperatur unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 6 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 44 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergeführt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

Es resultiert ein einfache verzweigtes dendrimäres Material mit Oxiranresten.

35

Beispiel 4

Aufpropfung eines Polymeren auf ein diolhaltiges Polymer (Erzeugung von mehrfach verzweigten dendrimeren Strukturen)

40 Das Material aus Beispiel 3 wird nochmals der in Beispiel 3 beschriebenen Reaktionsfolge unterworfen. Es entsteht ein zweifach verzweigtes dendrimäres Material mit Oxiranresten.

Dieses Material kann wiederum der in Beispiel 3 beschriebenen Reaktionsfolge unterworfen werden. Dabei entstehen dendrimäre Materialien mit Oxiranresten und mit höhergradiger Verzweigung.

45

Beispiel 5

Synthese eines mit Diethylamin substituierten dendrimeren Trennmaterials

50 100 ml abfiltriertes Gel hergestellt nach Beispiel 3 (einfach verzweigt) werden in 100 ml Wasser suspendiert und 100 ml Diethylamin zugegeben. Anschließend wird 20 Stunden bei Raumtemperatur weitergeführt. Danach wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 100 ml Wasser gewaschen.

Das gewaschene Reaktionsprodukt wird in 100 ml einer 0.5 M Schwefelsäurelösung suspendiert und zwei Stunden bei 40°C langsam gerührt. Danach wird mit 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7) bis zum Neutralpunkt, anschließend mit Wasser gewaschen. Das Gel wird in wäßriger Suspension unter Zusatz von 0,02% Natriumazid gelagert.

55

Beispiel 6

Synthese eines mit Diethylamin substituierten, zweifach verzweigten dendrimeren Trennmaterials

60 100 ml abfiltriertes Gel hergestellt nach Beispiel 4 (zweifach verzweigt) werden in wie in Beispiel 5 beschrieben mit Diethylamin umgesetzt.

In entsprechender Weise sind auch höher verzweigte mit Diethylamin substituierte dendrimäre Trennmaterialien zugänglich.

65

Beispiel 7

Herstellung eines Affinitätsträgers für die Metall-Chelat-Chromatographie

Eine Lösung von 15 g NaOH und 25 g Iminodiessigsäure in 100 ml Wasser wird mit konzentrierter HCl auf pH 11 eingestellt und mit 1 g Aktivkohle entfärbt. Zu dieser Lösung werden 50 ml abgesaugtem oxiran-aktiviertem Trägermaterial hergestellt nach Beispiel 4 (zweifach verzweigt) gegeben. Die Lösung wird bei 45°C 20 Stunden geführt. Das Reaktionsprodukt wird abgenutscht, mit je 250 ml 0,5 M NaOH und mit Wasser gewaschen. Die nicht umgesetzten Oxirangruppen durch Behandlung mit 100 ml 0,5 M Schwefelsäure (2 Stunden, 45°C) hydrolysiert. 5

Anschließend wird das Affinitätsträgermaterial einmal mit 100 ml 0,5 M Schwefelsäure, zweimal mit 100 ml Wasser, einmal mit 100 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7 und einmal mit 100 ml 1 M NaCl-Lösung gewaschen. Das Gel wird in 0,02 M Phosphatpuffer pH 7 mit einem Zusatz von 1 M NaCl und 0,02% NaN₃ gelagert. 10

Beispiel 8

Herstellung eines sauren Ionenaustauschers

Stufe 1

15

100 ml Gel hergestellt nach Beispiel 3 werden in 160 ml 0,5 M Schwefelsäure suspendiert und eine Stunde bei 45°C gerührt. Anschließend wird dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen.

Stufe 2

20

10 g NaOH werden in 200 ml Wasser gelöst und 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure zugefügt, bis der pH 4 beträgt (ca. 45 g; Monomerenlösung). Als Starterlösung für die Polymerisation werden 8,2 g Ammoniumcer(IV)nitrat in 50 ml 0,5 M Salpetersäure gelöst. 25

100 ml Gel aus Stufe 1 werden in der Monomerenlösung suspendiert und in einen Dreihalskolben gefüllt, die Starterlösung wird in den daran angeschlossenen Tropftrichter gefüllt. Die Apparatur wird dreimal evakuiert und mit Argon begast. Unter Röhren (150 UpM) wird nun die Starterlösung zulaufen lassen und anschließend bei 40°C vier Stunden weitergerührt. Anschließend wird das Produkt mit 200 ml 1 M Natriumsulfit in 1 M Schwefelsäure, mit 1 l Wasser, mit 31 0,1 M NaOH, mit 500 ml 1 M Natriumacetatpuffer pH 7 und mit 500 ml Wasser gewaschen. Das Produkt wird in 20 mM Phosphatpuffer pH 7 mit einem Zusatz von 0,02% NaN₃ gelagert. 30

Das folgende Anwendungsbeispiel zeigt den Einfluß des Verzweigungsgrades auf Bindungskapazität und Trennvermögen des Trennmaterials.

Anwendungsbeispiel A

35

Einfach bis siebenfach verzweigte DEA-derivierte Trennmaterialien (Proben 2–7) werden entsprechend den Beispielen 5 und 6 hergestellt, unverzweigtes Vergleichsmaterial (Probe 1) wird in Analogie zu Beispiel 5 hergestellt, wobei statt des dendrimeren oxiranhaltigen Polymers das lineare Polymer aus Beispiel 1 benutzt wird.

Diese Trennmaterialien werden jeweils in eine SuperFormance® Glassäule (50 × 10 mm) gefüllt und mit dem Auftragepuffer (50 mM TRIS-Puffer, pH 8,3) äquilibriert. Eine Lösung von Rinderserumalbumin (10 mg/ml) in diesem Puffer wird kontinuierlich aufgetragen (Fluß: 0,5 ml/min) und das Elutionsdiagramm durch Photometrie bei 280 nm gemessen. Aus der Durchbruchskurve wird die Kapazität bestimmt. Das Trennverhalten für Rinderserumalbumin wird ebenfalls bestimmt und als Selektivitätsfaktor α ausgedrückt. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 zusammengestellt. 40

Es zeigt sich, daß die Selektivität α (Kurve A) von verzweigtem Material deutlich höher ist als von unverzweigtem Material. Die Bindungskapazität (Kurve B) nimmt, verglichen mit unverzweigten Vergleichsmaterial, bei geringer Verzweigung zu, fällt aber bei starker Verzweigung deutlich ab. 45

Patentansprüche

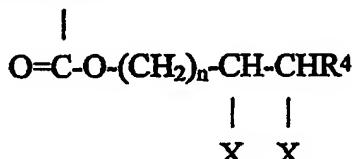
50

1. Dendrimere Ppropolymerate auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
- b) die kovalent gebundenen Polymere über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
- c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel II enthalten

55

-(CR¹R²-CR³)-



II

65

5 d) die dendrimeren Polymeren Monomereinheiten der Formel III enthalten,

10 - $(CR^1R^2-CR^3)-$



15 III

10 worin

15 R^1, R^2 und R^3 unabhängig voneinander H oder CH_3 ,

20 R^4 H, C_1-C_5 -Alkyl oder C_6-C_{12} -Aryl,

25 n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

30 ein Rest X OH und der andere Rest X eine endständige Monomereinheit einer weiteren Polymerkette darstellt,

35 und

40 Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält,

45 bedeutet.

50 2. Dendrimere Ppropfpolymerivate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Separationseffektor einen ionischen oder ionogenen Rest enthält.

55 3. Dendrimere Ppropfpolymerivate nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Rest Y nach Formel IV enthalten ist,

25 $O=C-O-(CH_2)_n-CH-CHR^4$

30 IV



50 worin

55 R^4 H, C_1-C_5 -Alkyl oder C_6-C_{12} -Aryl,

60 n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

65 ein Rest Z OH und der andere Rest Z einen Rest, ausgewählt aus der Gruppe NR^5R^6 , $N^+R^5R^6R^7$ und SO_3H ,

70 und

75 R^5, R^6 und R^7 unabhängig voneinander C_1-C_4 -Alkyl, wobei einer oder beide Reste R^5 oder R^6 auch H sein kann,

80 bedeutet.

85 4. Dendrimere Ppropfpolymerivate nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Rest Y nach Formel VI enthalten ist,

45 $O=C-W$

50 VI

55 worin

60 WOH oder NHR^8

65 und

70 $R^8 C_1-C_{10}$ -Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest substituiert ist,

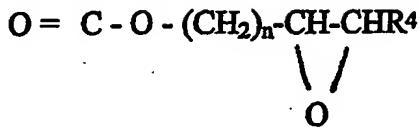
75 bedeutet.

80 5. Dendrimere Ppropfpolymerivate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rest Y einen Affinitätsliganden enthält.

85 6. Verwendung von dendrimeren Ppropfpolymerisaten mit den Merkmalen von Anspruch 1 bei der Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitsschomatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie.

90 7. Verfahren zur Herstellung von dendrimeren Ppropfpolymerisaten, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

95 a) Aufpropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,

CR¹R²=CR³

I

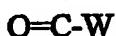
5

worin
 R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,
 R⁴ H, C₁—C₅-Alkyl oder C₆—C₁₂-Aryl
 und
 n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5
 bedeuten,
 b) zumindest teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;
 c) Aufpropfung von Monomeren der Formel I oder von Monomeren der Formel V auf die in Schritt b)
 entstandenen Diolgruppen in Gegenwart von Cer(IV)ionen,

10

15

20

CR¹R²=CR³

V

25

worin
 W OH oder NHR⁸
 und
 R⁸ C₁—C₁₀-Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest substituiert ist, 30
 bedeuten,
 wobei die Schritte b) und c) einmal oder auch mehrfach wiederholt werden können,
 und
 d) Einführung der Reste, die die Separationseffektoren enthalten, soweit diese nicht bereits durch die Aufpropfreaktion mit Monomeren der Formel V erfolgt ist. 35
 8. Verfahren zur Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie, unter Verwendung von dendrimeren Ppropfpolymerisaten mit den Merkmalen von Anspruch 1. 40

45

 Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

Fig. 1

